

# 低弾性 型チタン合金 (Ti-Nb-Sn) 製髄内釘がマウス脛骨骨折治癒に及ぼす影響についての検討

著者	藤澤 博一
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17445号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122327">http://hdl.handle.net/10097/00122327</a>

# 低弾性 $\beta$ 型チタン合金 (Ti-Nb-Sn) 製髓内釘がマウス 脛骨骨折治癒に及ぼす影響についての検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座整形外科分野

藤澤 博一

1. 要約
2. 略語
3. 研究背景
4. 研究目的
5. 研究方法
6. 研究結果
7. 考察
8. 結論
9. 参考文献
10. 謝辞
11. 図

## 1.要約

【緒言】チタン合金は強度が高く、耐食性に優れ、高い骨親和性を持つ。そのため整形外科用生体材料として広く使用されている。特に Ti-6Al-4V 合金は強度が高く、チタン合金製の整形外科インプラントに広く使用されている。しかし、そのヤング率は約 110GPa であり生体内の皮質骨のヤング率 (10-30GPa) に比べて非常に高く、ヤング率の違いが荷重伝達の不均衡を来し応力遮蔽 (stress shielding) の原因になる。東北大学金属材料研究所で開発された高機能チタン合金 (Ti-Nb-Sn 合金) は優れた強度を有し、皮質骨に近いヤング率 (約 40GPa) を持つ。さらに、Ti-Nb-Sn 合金は傾斜機能特性を持ち、熱処理加工によって弾性率を向上させることができる。また、同一材料内でヤング率の傾斜的な分布を作り出すことが可能である。低弾性金属材料を用いた骨折治癒過程に関する研究はこれまでのところ、ヤング率の低い金属で骨折部を固定することにより骨折部に適度なマイクロモーションを誘導し、仮骨形成を促進させるとする報告もあるが、一方で骨癒合効果が低減するとの報告もあり、低弾性金属材料による骨折治癒の促進効果は未だ明らかになっていない。

【目的】本研究の目的は、加熱処理により 2 種類の異なるヤング率 (45GPa と 78GPa) を持たせた Ti-Nb-Sn 合金製髓内釘を使用してマウス脛骨骨折モデルを解析し、従来金属であるステンレス鋼と比較することで低弾性チタン合金材料が骨折治癒過程に及ぼす影響を評価することである。

【方法】2 種類の異なるヤング率 (45GPa と 78GPa) を持つ Ti-Nb-Sn 合金とステンレス

鋼をマウスの脛骨髓内釘として挿入後に Bonnarens らの報告に基づきマウス脛骨に閉鎖性骨折を作成した。骨折後 7、10、14、21、28 日目の X 線像（各群 6 匹）、骨折後 14 日目のマイクロ-CT 像（各群 6 匹）を撮影して放射線学的解析を行なった。骨折後 7、10、14、21、28 日目のアルシアンブルー染色組織像（各群 6 匹）により組織学的解析を行なった。Real-time PCR を用いて骨折後 7、10、14 日目の *Col1a1*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Dkk1*, *Acp5* の遺伝子発現（各群 6 匹）を解析した。

【結果】X 線像では、全例で骨折 14 日目から骨性仮骨が見られ始め骨折後 21 日目には全例で骨癒合が得られた。仮骨のマイクロ-CT 像および構造解析において、45GPa Ti-Nb-Sn 合金群は仮骨内の骨量は最も多く、ステンレス鋼群では骨量は最も少なかった。仮骨サイズや外殻形成には差はみられなかった。組織学的所見では、ステンレス鋼群では Ti-Nb-Sn 合金群に比べ仮骨内の軟骨吸収、新生層板骨の形成の遅れがみられた。Real-time PCR では骨形成マーカーである *Col1a1* の発現は Ti-Nb-Sn 合金群で上昇していた。軟骨形成マーカーである *Col2a1*、軟骨成熟マーカーである *Col10a1* の発現は骨折後 14 日目では Ti-Nb-Sn 合金群は有意に低下していた。wnt シグナルを抑制し骨形成を抑制するマーカーである *Dkk1* の発現は、骨折後各群で時間経過と共に上昇し、骨折後 14 日目では Ti-Nb-Sn 合金群で有意に上昇していた。破骨細胞の活性マーカーである *Acp5* はステンレス鋼群に比べ 7 日目では 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群で有意に上昇し、10 日目では 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群で有意に上昇していた。

【考察】組織学的評価による軟骨吸収、新生骨形成は Ti-Nb-Sn 合金群で亢進しており、その結果は Real-time PCR の結果と矛盾していなかった。またマイクロ・CT による新生骨形成の評価も Ti-Nb-Sn 合金群で有意に亢進しており、同様の結果であった。このことより、Ti-Nb-Sn 合金は骨折治癒過程において軟骨形成、骨新生、骨リモデリングという一連の過程を骨折部の長軸方向のマイクロモーションを適切に調節することで促進していると推察された。

【結論】皮質骨に近い低ヤング率を有する Ti-Nb-Sn 合金は骨折部に適度なマイクロモーションを誘導し高弾性のステンレス鋼に比べて骨折治癒過程を促進する。

## 2.略語

- ・ Ti-6Al-4V 合金 Ti (Titanium ; チタニウム)-6Al (Aluminium ; アルミニウム) -4V (Vanadium; バナジウム) 合金
- ・ CP-Ti (commercially pure titanium; 工業用純チタン)
- ・ Ti-Nb-Sn 合金 (Titanium ; チタニウム-Niobium ; ニオブウム-Stannum ; スズ) 合金
- ・ GPa ( ギガパスカル )

## 3.研究背景

骨折治療の最終目標は骨折部が骨癒合し、受傷前の骨組織構造や力学的強度を取り戻し、

日常生活動作に支障なく生活を送ることにある。骨折治癒過程では様々な生物学的な因子や力学的因子が関与しており相互的に作用している。骨折治療の 90～95%は良好な治療結果が得られているものの[1]、骨癒合が得られなかった症例における原因は様々である。そのため、骨癒合が起こるためにどのような力学的環境が最良の状態であるかは現時点でも議論の余地がある。骨細胞、骨芽細胞は機械的負荷に反応して増殖し、また基質産生を行い、サイトカインや成長因子の調整を行なっている[2]。

骨折部には様々な応力が複雑に生じていることが知られている。骨折型、骨片間の距離（転位）、骨折部固定材料の性質、骨折部にかかる荷重や回旋力、曲げ応力、引っ張り力によって骨癒合過程は影響を受ける[2-7]。引っ張り力は骨折部に動揺性を生み、一方で圧迫力は骨折部に嵌入力を生じる。ねじれはせん断力を生み、曲げは一方に圧迫力を生じその反対側には引き離す力を生じる[3]。

骨折部にかかるこのような応力の違いやその大きさがどのように骨折の治癒過程に影響を与えるかという問題に関する研究は多く報告されている[4, 8-12]。固定材料によって骨折部の力学的環境は大きく変化するためどのような固定材料が最も至適であるかに関しても意見は一致していない。骨折部の動きを適度に許容した固定（flexible fixation）を行なうと骨折部でのマイクロモーションを誘導し仮骨形成や骨新生は亢進し力学的にも優れた骨折治癒が得られる[3, 13-15]。Utvag らは弾性率の異なる髓内釘を使用してラットの大腿骨の力学的強度と骨密度を計測し、弾性率が正常の大腿骨に一番近いチタン製髓内釘が

最も骨折部の強度が強かったこと、仮骨部の骨密度もチタン製髓内釘が最も高かったことを報告している[3]。骨皮質に弾性率の近似する金属による固定は骨折部に適当な微細な動きを誘導し骨癒合を促進し力学的に優れた骨癒合を得ることが出来る。応力の違いに関しては、軸方向の適度な圧迫力は骨膜での仮骨形成を促進し骨癒合率を改善することがよく知られている[16, 17]。反対にねじれによるせん断力は軸方向の圧迫力に比べると骨折部での仮骨形成は劣り骨癒合にも不利である[18]。また、骨折部の不安定性が過度な低弾性固定材料では、固定性が不良になり骨癒合不全を来たすことも多いとする報告もある[19, 20]。

**flexible fixation** は骨折部の整復位、アライメントを保持する強度があるか疑問もあり臨床の場では許容されていない[21, 22]。通常、骨折部の内固定材料として使用される金属材料はステンレス鋼やチタン合金が主体であるが[23]、至適な内固定材料の弾性率は未だ明らかにはなっていない。

チタン合金は強度が高く、耐食性に優れ、高い骨親和性が特徴であり整形外科用生体材料として広く使用されている[24]。チタン合金は結晶構造によって、**CP-Ti** に代表される  $\alpha$  合金、**Ti-6Al-4V** 合金に代表される  $\alpha + \beta$  合金、そして  $\beta$  合金に大別される[25]。本来、航空機用材料として開発された **Ti-6Al-4V** 合金は、整形外科領域では生体用金属材料として広く使用されている[26]。現在、整形外科領域で人工関節などに使用されている金属材料はチタン合金の他に **Co-Cr** (**Cobalt-chromium**；コバルト-クロム)合金やステンレス鋼がある。そのヤング率は **Co-Cr** 合金が 230GPa、ステンレス鋼が 205GPa である。また **Ti-6Al-4V**



合金のヤング率は約 110GPa であり Co-Cr 合金やステンレス鋼に比べてヤング率は低いものの[27]、生体内の骨皮質のヤング率 (10-30GPa) に比べて非常に高く、そのヤング率の違いが荷重伝達を障害して応力不均衡を生じ、廃用性骨萎縮を来たとされる。このような現象は応力遮蔽 (stress shielding) として知られ、術後疼痛の原因として問題視されている[13, 28, 29]。骨皮質のヤング率計測法はこれまで多く報告されており、Ashman らは continuous wane method を使用し骨皮質のヤング率を計測した[30]。また、Katsaminis と Raftopoulos らは universal instron machine を用いた計測結果を報告し[31]、近年では Cuppone らが死体骨の CT (Computed tomography) を使用した大腿骨の骨皮質のヤング率の計測を行い、そのヤング率は 18GPa から 19GPa であることを報告している[32]。ヤング率とは縦弾性係数といわれ、引っ張り力に対する変形のし難さを表しそれが大きければ弾性範囲にある物体は変形し難い。強度 (骨組織の硬さ) とは骨が耐えられる最大応力を示している。骨組織は、脊椎動物をはじめとした骨格を有する動物の運動には不可欠な臓器であり、歯を除く他の組織と比較して非常に硬い組織である。

このような Ti-6Al-4V 合金の生体内での不利な機械的条件を改善すべく近年ヤング率が低い  $\beta$  型チタン合金が開発され、臨床応用の試みも始まっている[33, 34]。Long らは  $\beta$  型チタン合金である Ti-35Nb-5Ta (tantalum : タンタル) -7Zr (zirconium : ジルコニウム) 合金のヤング率が 55GPa であり、CP-Ti と Ti-6Al-4V 合金を含む生体用チタン合金の中で最も低かったと報告している[27]。

東北大学金属材料研究所で開発された高機能チタン合金:Ti-Nb-Sn 合金[35–39]は優れた引っ張り強度をもち、皮質骨に近いヤング率（約 40GPa）を持つ $\beta$ 型チタン合金である。熱処理条件を最適化することで Long らの報告した[27] 55GPa よりも低いヤング率を獲得することが可能となった。

先行研究では Ti-Nb-Sn 合金の細胞毒性の評価、骨親和性の評価を行いその結果を報告してきた。細胞培養での毒性試験では、Ti-Nb-Sn 合金は Ti-6Al-4V 合金および CP-Ti と比較し、相対細胞増殖率に有意差が無く Ti-Nb-Sn 合金は細胞毒性が極めて低いこと、引き抜き試験の結果から Ti-Nb-Sn 合金は Ti-6Al-4V 合金と同等の優れた骨結合性があること、組織学的評価でも Ti-Nb-Sn 合金は Ti-6Al-4V 合金と同様の金属表面での骨新生を示し、高い骨誘導能を報告した[25]。また適切な陽極酸化によって成膜した酸化膜と温水処置によって骨誘導能や骨結合性がさらに強くなることを報告してきた[40]。さらに Ti-Nb-Sn 合金は適切な加熱処理を行なうことで同一材料内において、局所の弾性率と強度を段階的に上げることが出来る特性を持っている（図 1） [41]。このような金属材料は傾斜機能材料と呼ばれる。人工股関節の大腿骨ステムには、一つの材料内で大腿骨の皮質骨に近いヤング率が必要とされる遠位側部分と、非常に大きな過重負荷がかかり高い強度が求められる近位側部分が存在するが、従来の Ti-6Al-4V 合金は傾斜機能材料ではないため、部位ごとに適切な弾性率を付与することが出来なかったが、Ti-Nb-Sn 合金のこのような特性を利用することによって、同一ステム内でのヤング率を段階的に変化させより生体材料として優れた効果が得

られることが期待される。

## 4.研究目的

本研究の目的は、骨折固定金属材料のヤング率の違いが骨折治癒にきたす影響を解明することである。マウス脛骨骨折モデルにおいて、未処理 Ti-Nb-Sn 合金、加熱処理後 Ti-Nb-Sn 合金、さらにステンレス鋼による髄内釘を行い、骨折治癒過程を放射線学的、組織学的、分子生物学的検討を行い、低弾性固定材料の骨折治癒促進効果を明らかにする。

## 5.研究方法

本研究における動物実験の取り扱いは、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の審査および許可を得たうえで行った。(動物実験計画書番号：2014-医動 245)

### 5.1. 使用動物

本研究では C57BL/6 マウスを使用した。野生型の C57BL/6 マウスは Charles River Japan より購入した。使用したマウスは東北大学加齢医学研究所付属動物実験施設において specific pathogen-free (SPF) の条件下で管理、飼育した。実験は国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に準拠しておこなった。全ての実験は 12 週齢雌のマウスを使用しておこなった。骨癒合の分野では、近年骨折固定材料の進歩によってマウスは使用

されるようになった。特に、骨折治癒過程における細胞の分化や増殖に関して分子生物学的分析を行なう際には、遺伝学的に明確な裏づけのあるマウスは適している[42]。

## 5.2. Ti-Nb-Sn 合金

Ti-25%Nb-11%Sn 合金は純 Ti（純度 99.9%）、純 Nb（純度 99.9%）および純 Sn（純度 99.9%）から高周波誘導溶解法で鑄塊を作成し、合成組成を均一化するために鑄塊を数ピースに細断後、真空アーク溶解で再溶解した。この再溶解した鑄塊を 1100℃で 5mm のロッドまで鑄造した後、熱間および冷間圧延によって 0.4mm の太さに加工し 45GPa の Ti-Nb-Sn 合金を作成した。さらにこの Ti-Nb-Sn 合金ワイヤーの一部をクォーツ（石英）チューブ内に封印して 420℃で 5 時間加熱処理し 78GPa の Ti-Nb-Sn 合金を作成した。これを長さ 17mm に加工して骨折部の固定材料とした。Ti-Nb-Sn 合金ワイヤーのヤング率は自由振動法を用いて測定した。対照群として同径、同じ長さのステンレス鋼を使用した。

ヤング率は剛性率やポアソン比と同様に材料の変形強度を示す重要な要素の一つであり、構造物の構造設計や解析には必要不可欠な物性値である。ヤング率（単位：GPa；ギガパスカル）は縦弾性係数といわれ、物体を引っ張ったときの応力と歪の関係であり、物体が弾性範囲にあれば応力と歪は比例関係にある。したがって、弾性範囲にある物体は応力を大きく作用させると歪は大きくなる。この関係は図 2 に示した通りで、ヤング率が高い物体は同じ大きさの応力を加えた場合には変形し難く逆にヤング率が小さな物体は小さな応力で

もその歪が大きくなる（変形し易い）。（図 2）  $\sigma = E \varepsilon$ （応力＝ヤング率×伸び率）の公式  
がから  $\varepsilon = \sigma / E$ （伸び率＝応力/ヤング率）の関係が成り立つ。

### 5.3.骨折モデルの作成

骨折の作成は 2%イソフルラン(フォーレン; Abbott, Wiesbaden, Germany)の吸入麻酔下  
に行った。右脛骨近位端から骨髓腔内へ直径 0.4mm、長さ 17mm の鋼線を挿入後、  
Bonnarens らの報告した骨折装置（図 3-A）[43, 44]を用いて脛骨骨幹部に閉鎖性骨折を作  
成した。Ti-Nb-Sn 合金が傾斜機能材料である性質を利用して、加熱処理により 2 種類のヤ  
ング率（それぞれ 78GPa のものと 45GPa）の異なるものを作成して使用した。対照群とし  
て同径のステンレス鋼（ヤング率＝194GPa）を使用して同様にマウス脛骨骨折モデルを作  
成した。

再現性の高い閉鎖性横骨折の作成は、麻酔下でまずはマウスの脛骨近位端部から、18 ゲ  
ージ針をオールとして使用し、骨孔を作成後に、上記の金属材料を脛骨骨髓内に挿入した。  
骨折後に髓内釘挿入を行うと骨折部の転位によって挿入が困難となる。複数回の挿入操作  
によって骨折部周囲の軟部組織に他の損傷が起こり骨折の治癒過程に影響を及ぼすと考え  
られるため、髓内釘の挿入直後に骨折の作成を行った。（図 3-A）骨折装置は、毎回 230 g  
の重錘を 17cm の高さから落下させることによって先端が鈍な刃先が作動し再現性の高い  
エネルギーを与え骨折を作成する装置である。全てのマウスにおいて、骨折作成直後にゲー

ジ内での患肢への加重を自由に許可した。実験当初は、手技の未熟さから斜骨折例などが存在したが、手技を習熟することで再現性の高い横骨折を作成することが出来た。

骨折後 7、10、14、21、28 日目に頸椎脱臼による安楽死処置を行い、直ちに 4%パラホルムアルデヒドによる経動脈還流固定後に右下肢を摘出し、大腿骨、足部、皮膚を切除して脛骨を取り出した。

## 5.4.評価時期の決定

先行研究における組織学的所見から[45]、骨折後の経過時期を炎症期、軟骨形成期、骨形成期、リモデリング期の 4 期に分類される。本研究では骨折後 7 日目を軟骨形成期、骨折後 10 日目を骨形成期、骨折後 14 日目をリモデリング初期、その後をリモデリング期として評価項目を決定した[46]。

## 5.5.X 線評価

骨折後 7、10、14、21、28 日目に Ti-Nb-Sn 合金 (78GPa、45GPa)またはステンレス鋼が挿入されたマウス骨折モデル（各群 6 匹）の右脛骨を摘出した直後に軟 X 線撮影装置 (SRO-M50, Sofron, Tokyo, Japan) (20kV, 2.0mA, 10sec)および X 線フィルム (Biomax XAR film, Carestream Health Co., New York, USA) を用いて脛骨側面像撮影を行い、骨折部における仮骨の形成および骨癒合を評価した。X 線像における仮骨の骨化および骨癒

合の判定には筆者（整形外科医歴 13 年目）及びもう一人の整形外科医（同 17 年目）2 名による確認を行なった。骨折部周囲の軟部陰影内における透過性低下領域の出現を仮骨の骨化、仮骨内骨化領域による骨折部の不連続性の消失を骨癒合と定義した。X 線撮影後の脛骨を続く 5.7. の非脱灰凍結切片作成に利用して、組織学的評価を行った。

## 5.6. マイクロ CT 評価および構造解析

Ti-Nb-Sn 合金(78GPa、45GPa)とステンレス鋼を使用したマウス骨折モデル(各群 6 匹)の脛骨を摘出しマイクロ CT 撮影を行った。マイクロ CT はマウスの骨折後、過去の報告に基づき[45]骨性仮骨が完成する骨折後 14 日目に撮影した。摘出した脛骨をマイクロ CT スキャナー（Scan Xmate-L090 ; Comscan Techno Co., Ltd, Kanagawa, Japan）を用いて撮影した。撮影条件は電圧 75kV、電流  $100\ \mu\text{A}$ 、解像度  $10.352\ \mu\text{m/pixel}$ 、スライス厚  $10.352\ \mu\text{m}$ 、マトリクス数  $516\times 506\ \text{pixel}$  で骨折部を中心に上下 506 スライス= $5.238\text{mm}$ を撮影範囲とした。仮骨断面積が最大となる横断像において、仮骨における軟骨仮骨から新生骨へのリモデリングを評価するために Image J version1.47t(<http://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて仮骨の総面積（TV）および骨組織量（BV）を算出した。また単位面積当たりの骨量（BV/TV $\times 100$ ）を算出した。また過去の報告に準じて仮骨の骨性外殻形成(new cortical shell area / TV, %)を算出した。[45]

## 5.7.非脱灰凍結切片作成

摘出した脛骨を 4%パラホルムアルデヒドに 48 時間浸漬し固定を行った後、30%スクロースに 24 時間浸漬して脱水した。髓腔内の固定金属を除去した後に脛骨非脱灰標本を OCT コンパウンド(Tissue-Tec; Sakura Finetek, CA, USA)へと包埋し、液体窒素に浸漬して凍結させ切片作成時まで-80℃で保存した。クライオスタット(Bright, Huntingdon, UK)およびミクロトーム刃 (S35 Fine, Feather Safely Razor, Osaka, Japan) を用いて矢状断面方向に 7  $\mu$  m の厚さで連続切片を作成した。矢状断面での中央付近の切片をその後の染色、組織学的評価に用いた。切り出した凍結切片は直ちにクライオフィルム (Cryofilm Type II C (10), Section-lab, Hiroshima, Japan) へ貼り付け、標本面を上方にしてクライオフィルムをスライドグラスに載せ、染色時まで 4℃で保存した。

## 5.8.組織学的評価

骨折後 7、10、14、21、28 日目の凍結切片にアルシアンブルー染色を行った (各群 6 匹)。染色後、光学顕微鏡 (BX51 microscope; Olympus, Tokyo, Japan) および付属のソフトウェア (CellSens Standard version 1.7; Olympus, Tokyo, Japan) を使用して観察し、画像をデジタルカメラ (DP73; Olympus, Tokyo, Japan) にて撮影した。

## 5.9.組織定量評価



アルシアンブルー染色標本を用いて、組織像の定量的評価を行った。骨折後 7、10、14、21、28 日目の標本（各群 6 匹）を用いて仮骨の総面積、軟骨基質領域、新生骨領域の面積を計測して仮骨内における軟骨基質領域、新生骨領域の面積の割合を計測した。面積の測定は、Image J version 1.47t(<http://imagej.nih.gov/ij/>)を使用して行なった。ImageJ に組織標本画像を取り込み、その後 Split channels を使用して 3 原色（赤、青、緑）に分割しその中の赤、青を選択しその後 difference というコマンドを使用して軟骨領域を抽出した。さらに元のアシアンブルー染色標本の画像を参照しながら閾値を設定し、軟骨基質領域を抽出し計測した。また、間質部分の閾値も同様に設定して仮骨の総面積から軟骨基質領域、間質を除いて新生骨領域を算出した。

## 5.10. Real-Time PCR

骨折後 7、10、14 日目にマウスの骨折部仮骨を採取した（各群 6 匹）。採取した組織を冷却下に Polytron Homogenizer (PT-MR2100; Kinematica, Switzerland) を用いて均一に粉砕し、Trizol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) 1ml で mRNA を抽出し、RNeasy Mini Kit for RNA extraction (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて mRNA を精製した。精製した mRNA は Nano Drop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific Nano Drop Products, Delaware, USA) を使用して濃度を計測した。その後、mRNA は 50ng/μl 程度の濃度になるように RNase-free water で希釈し逆転写を行なう前に各サンプルの濃度を調整した。濃度調整を行なった mRNA に RT Buffer, RT random primers, dNTP

mix, Murtiscribe™ reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster city, Ca, USA) を加えて、Gene Amp®PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を用いて 25°Cで 10 分間、37°Cで 2 時間逆転写し cDNA を合成した。

得られた cDNA を Nano Drop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific Nano Drop Products, Delaware, USA) を使用して濃度を計測し、5ng/μl 程度の濃度まで希釈した。その後、ready-to-use Taqman® Gene Expression Assays 1 μl および Taqman® Universal Master Mix II with Uracil-N Glycosylase 10 μl (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を加え、Taqman® Gene Expression Assays プロトコールに従い StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を用いて 50°C2 分、95°C10 分を各 1 回、さらに 95°C15 秒と 60°C1 分を 40 サイクル反応させて real-time PCR を行なった。*Gapdh* を内部標準とした。Taqman®プローブは以下のものを使用した。*Col1a1* は主に骨芽細胞により合成され骨の有機基質の 95%を占める I 型コラーゲンの遺伝子であり、骨形成を反映する。*Col2a1* および *Col10a1* は軟骨基質の主成分である II 型コラーゲンおよび X 型コラーゲンの遺伝子であり、X 型コラーゲンは増殖後の軟骨細胞が成熟し肥大軟骨層でみられ、いずれも軟骨形成を反映する。*Dkk1* は骨芽細胞の分化、活性化経路である wnt / β catenin 伝達経路の阻害因子である dickkopf1 分子の遺伝子である。また *Acp5* は破骨細胞のマーカーである Tartrate resistant acid phosphatase の遺伝子であり骨吸収反応を反映する。

解析は StepOne software version2.2.2 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を用いて行い、それぞれの mRNA の発現量を各評価時点における内部標準に対する fold change として求めた。

使用したプローブ

*Col1a1* プローブ : Assay ID : Mm00801666\_g1

*Col2a1* プローブ : Assay ID : Mm01309565\_m1

*Col10a1* プローブ : Assay ID : Mm00487241\_m1

*Dkk1* プローブ : Assay ID : Mm00438422\_m1

*Acp5* プローブ : Assay ID : Mm00475698\_m1

*Gapdh* プローブ : Assay ID : Mm99999915\_g1

## 5.11.統計処理

統計学的処理は JMP, version 11.2 (SAS, Cary, NC, USA)を用いて行った。データは平均値±標準誤差を用いて表した。各群間での組織形態計測分析、マイクロ CT による構造解析、mRNA の発現量について統計学的有意差判定を one-way ANOVA にて分散分析を行い、各群の平均値の差は Tukey-Kramer の検定法を使用して行なった。危険率 5%を有意水準として検定した。

## 6 結果

### 6.1. X線所見

代表的な脛骨骨折の X 線像を図 3 に示す。全例骨癒合を獲得し、Ti-Nb-Sn 合金、ステンレス鋼の折損例はみられなかった。骨折後 14 日目で骨性仮骨は全例でみられるようになり、21 日目で全例骨癒合が得られ外殻形成も全例にみられた。28 日目では全例骨皮質の吸収が始まり骨リモデリングも進んでいた。

### 6.2. マイクロ CT

骨折後 14 日目のマイクロ CT の仮骨部の代表的な横断面スライス図 4A に示す。45GPa Ti-Nb-Sn 合金群において仮骨内の新生骨形成がステンレス鋼群に比して進行していた。

骨構造解析結果を図 4B に示す。骨折後 14 日目では TV は各群間に有意差はみられなかった。45GPa Ti-Nb-Sn 合金群の BV はステンレス鋼群に対して有意に大きかった ( $p<0.01$ ) が 78G Pa Ti-Nb-Sn 合金群との間には有意差はみられなかった。また 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群とステンレス鋼群の間に有意差はみられなかった。BV / TV は 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群、78GPa Ti-Nb-Sn 合金群でステンレス鋼群に比べ有意に大きかった。(78GPa Ti-Nb-Sn 合金群 ;  $p<0.001$ 、45GPa Ti-Nb-Sn 合金群 ;  $p<0.001$ ) Ti-Nb-Sn 合金を使用したマウスの構造解析に結果を比較すると 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群と 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群の間に有意差はみられなかった。骨折部仮骨の外殻形成には各群間に有意差はみられなかつ

た。

### 6.3.組織学的評価

骨折後 7、10、14、21、28 日目のアルシアンブルー染色を行った組織像を図 5A に示す。

7 日目では各群ともに骨折部周囲に骨折部を中心にドーム状に仮骨が形成されその内部には軟骨基質がありアルシアンブルーで染色されていた。骨折後 10 日目では仮骨の辺縁から中心へ向かって進行する膜性骨化反応がみられ、仮骨の辺縁部に比して骨折部を中心として軟骨基質が多く残存していた。14 日目では、Ti-Nb-Sn 合金群では軟骨基質の吸収が進み、層板骨が仮骨内のほとんどを占めるようになったが、ステンレス鋼群では軟骨領域が残存していた。Ti-Nb-Sn 合金群では骨折部の間隙は新生骨で架橋されていたが、一方でステンレス鋼群では骨折間隙の架橋形成は不十分であった。21 日目では Ti-Nb-Sn 合金群、ステンレス鋼群ともに骨癒合しており外殻形成が明らかになっていたが 28 日目ではより外殻形成は鮮明になった。

組織像の定量的評価の結果を図 5B に示す。全評価時期を通して TV に各群間に有意差はみられなかった。軟骨基質領域の割合は骨折後 7 日目では各群間に有意差はみられなかったが、骨折後 10 日目、14 日目ではステンレス鋼群は Ti-Nb-Sn 合金群に対して有意に軟骨基質領域は多く残存していた(10 日目、78GPa 群 : n.s.、45GPa 群 :  $p < 0.05$  ; 14 日目、78GPa 群 :  $p < 0.01$ 、45GPa 群 :  $p < 0.001$ )。骨折後 7 日目から経時的に各群とも新生骨領域の割合は増加していた。骨折後 7 日目、10 日目、14 日目で Ti-Nb-Sn 合金群の新生骨領域はステ

ステンレス鋼群に対して有意に大きかった(7日目、78GPa :  $p < 0.01$ 、45GPa :  $p < 0.01$  ; 10日目、78GPa :  $p < 0.001$ 、45GPa :  $p < 0.001$  ; 14日目、78GPa :  $p < 0.01$ 、45GPa :  $p < 0.001$ )。21日目以降では、各群とも仮骨内の軟骨領域はほとんど消失し新生した層板骨で置換されており各群間に有意差はみられなかった。

## 6.4. Real time-PCR

骨折後 7、10、14 日目の骨折部仮骨内における *Colla1*、*Col2a1*、*Col10a1*、*Dkk1*、*Acp5* の発現を図 5 に示す。骨基質分子の遺伝子である *Colla1* 発現量は骨折後 14 日目までは各群とも経時的に増加していた。78GPa Ti-Nb-Sn 合金群の *Colla1* 発現量は骨折後 7 日目、10 日目においてステンレス鋼群に比べ有意に高かった (7 日目 :  $p < 0.05$ 、10 日目 :  $p < 0.01$ )。45GPa Ti-Nb-Sn 合金群における *Colla1* 発現量は骨折後 14 日目でステンレス鋼群に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。 *Col2a1* 発現量は骨折後 7 日目では 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群で他の 2 群に比べて有意に高かった(ステンレス鋼群 :  $p < 0.01$ 、45GPa Ti-Nb-Sn 合金群 :  $p < 0.05$ )。骨折後 14 日目ではステンレス鋼群の *Col2a1* 発現量は Ti-Nb-Sn 合金を使用した 2 群に対して有意に高かった (78GPa 群 :  $p < 0.001$ 、45GPa 群 :  $p < 0.001$ )。骨折後 14 日目におけるステンレス鋼群の *Col10a1* 発現量は Ti-Nb-Sn 合金を使用した 2 群に対して有意に高かった (78GPa 群 :  $p < 0.001$ 、45GPa 群 :  $p < 0.001$ )。 *Dkk1* 発現量は骨折後、経時的に増加していた。14 日目においてステンレス鋼群の *Dkk1* 発現量は Ti-Nb-Sn 合金を

使用した 2 群と比較して有意に低かった (78GPa 群 :  $p < 0.05$ 、45GPa 群 :  $p < 0.05$ )。7

日目における 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群の *Acp5* 発現量はステンレス鋼群に比して有意に高かった。( $p < 0.05$ )。10 日目における 78G PaTi-Nb-Sn 合金群の *Acp5* 発現量はステンレス鋼群に比して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

以上の結果から、Ti-Nb-Sn 合金群は骨折後 7 日目から 14 日目まではステンレス鋼群と比較して骨形成は亢進しており、14 日目では Ti-Nb-Sn 合金群の軟骨代謝マーカーの発現量は減少し、軟骨吸収が促進されていることが示された。Ti-Nb-Sn 合金群では骨折治癒過程において骨新生と軟骨吸収はステンレス鋼群に対してより早期から促進されていることが示唆された。

## 7 考察

骨折部にかかる機械的刺激は仮骨形成や骨癒合に種々の影響を与える。しかしどのような骨折部の機械的環境が骨癒合に最も適した環境であるのかは不明である。曲げ応力や圧迫力は骨新生を促すことが知られている[3, 13–15]。Augat らはせん断力は軸方向の動きに比べ有意に骨癒合を遷延させると報告している[18]。Sha らは骨粗鬆症モデルのラットの大腿骨骨折モデルで、ヤング率が 33GPa の  $\beta$  型チタン合金と Ti-6Al-4V 合金で固定してその骨癒合過程を解析し骨折後 12 週では新生骨量は  $\beta$  型チタン合金の方が大きく仮骨の強度も  $\beta$  型チタン合金の方が優れていたことを報告している[47]。骨折部にかかる曲げ応力や圧迫

力は骨折部への血流を一過性に遮断して局所の虚血状態を引き起こす[48]。この一過性の局所的な虚血状態は骨膜細胞の分化を誘導する。低酸素状態では軟骨細胞はミトコンドリア内にカルシウム顆粒を蓄積し、細胞外器質に輸送する。カルシウムはリン酸と結合し仮骨内に石灰化したマトリックスを沈着する[49]。Molster らは、低弾性髄内釘は骨癒合は促進し、**stress shielding** を回避すると報告している[47, 50]。Utvag らは曲げ応力が正常の骨皮質に近似したチタン合金製髄内釘で固定した場合に力学的強度が最も優れていたと報告している[21]。より低弾性の金属で骨折部を固定すると初期のマイクロモーションは大きくなるが、それが大きいほど、より早期に骨性仮骨を形成し骨折部の不安定性は無くなるという報告もある[51]。以上の報告より、適切な弾性を持った髄内釘による骨折部の固定は骨癒合を促進して、力学的にも有利な骨折治癒を誘導すると考えられる。

本研究では、軟骨仮骨形成期にあたる骨折後 7 日目では組織学的には仮骨面積、軟骨領域には各群間に差はみられなかったものの、骨新生は Ti-Nb-Sn 合金群で進んでいた。また、骨形成マーカーである *Col1a1* の発現も Ti-Nb-Sn 合金群で多く、骨折初期から骨新生が促進していた。骨折後早期には骨折部の炎症反応に伴い増生したマクロファージなどの炎症細胞から TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインが放出され、間葉系幹細胞が骨折部に誘導され、軟骨形成、血管新生などの骨折修復機転が起きる[48]。この時期から骨折部の近位側と遠位側の辺縁から骨新生が起こり（膜性骨化）、仮骨内部では軟骨内骨化が進行して骨性仮骨が形成されていく[2]。Ti-Nb-Sn 合金群では固定金属材料の弾性率が低いこと



によって骨折部への効果的な長軸方向のマイクロモーションが作用し、骨折後早期の治癒過程では骨折部辺縁での骨形成（膜性骨化）が促進されているものと考えられた。また早期から破骨細胞の活性も高く Ti-Nb-Sn 合金群では骨リモデリングを含む骨修復機転が働いているものと考えられた。

骨折修復過程の骨形成期には種々のサイトカインが相互的に作用して軟骨の吸収、骨芽細胞の誘導、層板骨を形成し[48]、仮骨は強度を増していく。骨形成期にあたる骨折後 10 日目では、組織の軟骨領域は Ti-Nb-Sn 合金群では減少し始めて新生骨領域が大きくなった。さらに *Colla1*、*Acp5* の発現も亢進していることから Ti-Nb-Sn 合金群ではより骨新生、軟骨吸収、骨リモデリングが促進されていた。ステンレス鋼群では軟骨領域は多く残存し、骨形成が遅延していた。Ti-Nb-Sn 合金の適切な弾性が骨折部への機械的刺激を増大し仮骨内での骨形成期における修復過程は促進されているものと考えられた。

骨リモデリング初期にあたる骨折後 14 日目では、*Colla1* の生成は 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群では、ステンレス鋼群に比較して亢進しており、引き続き骨形成は促進されていた。ステンレス鋼群でも経時的に骨形成マーカーの上昇、破骨細胞の活性も上昇しており骨のリモデリングが追いついてきているものと考えられた。*Dkk1* は骨折治癒過程において wnt /  $\beta$  catenin シグナリングを遮断して骨芽細胞の分化・活性を抑制する[52, 53]。Ti-Nb-Sn 群の *Dkk1* の発現量はステンレス鋼群に比べ高く、逆説的な結果となった。*Dkk1* の発現の逆転については、*Colla1* の発現亢進に対する代償的な *Dkk1* の発現亢進の可能性が推

測された。

Augat らは機械的な不安定性は仮骨量に影響を与えなかったと報告しているが[15]、本研究でも同時期のマイクロ CT による仮骨面積の計測、組織学的な仮骨面積の計測結果は本実験で使用したヤング率が異なる 3 種類の固定金属材料の間には差はみられなかった。本研究で使用した金属の弾性率の差は仮骨サイズに影響に与えるような効果は示さなかった。

マウスの硬性仮骨形成は骨折後 14 日頃にピークを迎える[54]。Ti-Nb-Sn 合金群ではこの時期には仮骨内部の軟骨が概ね吸収され層板骨に置換され硬性仮骨が十分形成されていたが、ステンレス鋼群では層板骨への置換が遅れていた。低弾性 Ti-Nb-Sn 合金の適度な弾性による骨折部へのマイクロモーションが効果的に作用して、仮骨内部での骨折治癒過程が組織学的にも促進していることが示唆された。

骨リモデリング後期にあたる 21 日目以降の評価時期ではでは全群で骨癒合が X 線像、組織学的にも確認されていた。この時期においては、今回の検討では金属材料の弾性率の違いによる差異は生じなかった。

Histing らはマウスの大腿骨骨折モデルを作成し、髄内釘固定を行いその治癒過程を分析し、骨折後 2 週目では仮骨内の大部分の軟骨領域は層板骨へ置換しており、5 週目では仮骨内の骨化、リモデリングを含む骨癒合過程が完成していることを報告している[55]。本研究でも、Ti-Nb-Sn 群では仮骨内の骨化は 2 週でほぼ完成しており、4 週では全例骨癒合し骨リモデリング過程が進行していた。

今回の検討では、マウスの脛骨のサイズが小さく正確な力学的測定を行なうのは困難であることから、骨癒合後の骨の力学的強度試験を行うことが出来なかった。今後の研究の発展としては、Ti-Nb-Sn 合金を使用した骨折部の力学強度試験も含めて、より大型の動物で骨折治癒機構の解析を行なうことが望ましいと考えられた。

本研究では Ti-Nb-Sn 合金の傾斜材料特性を利用して、45GPa と 78GPa の 2 種類の弾性率の低弾性 Ti-Nb-Sn 合金による骨折治癒に対する低弾性金属材料による髄内釘固定の影響をステンレス鋼と比較検討した。また、45GPa と 78GPa の Ti-Nb-Sn 群間では放射線学的、組織学的、分子生物学的に骨形成、骨リモデリングにおいて有意な差は生じなかった。しかし、本研究で検討したパラメーターに関しては 45GPa の方が 78GPa に比べ骨形成、軟骨吸収は同時期においてより進んでおり、骨皮質に近いヤング率を持ったチタン合金の方が骨折治癒過程は促進していた。本研究の分析結果からは有意差は得られなかったが、骨皮質に近いヤング率を有したチタン合金は同じ金属組成であってもより強い骨癒合促進作用を有する傾向があると考えられた。

今後の展望として、よりヤング率が骨皮質に近いチタン合金を追求していけば最終的には約 20GPa 程度のヤング率を有する固定材料が開発されることが望ましいが、そのような材料の強度や骨片の位置関係の維持能力（再転位が起こらないかどうか）、偽関節を起こさないか否かなどの問題は生じる可能性がある。しかし、そのような金属材料は開発されておらず、今後の金属材料の開発、基礎実験、臨床応用に期待される分野である。

また、本研究結果を考慮すれば、加熱処理により弾性率が上昇した Ti-Nb-Sn 合金も未処理の Ti-Nb-Sn 合金と統計学的には同等の低弾性による骨折癒合促進効果を有していることを示唆する結果であると解釈出来た。加熱処理による弾性率の上昇とともに金属強度の上昇も来すことから、傾斜機能特性を活かして加熱処理を行った Ti-Nb-Sn 合金は骨折治療を含めて整形外科インプラントに理想的な特性を有する金属材料であることが期待される。

## 8 結論

本研究結果から、Ti-Nb-Sn 合金 (45GPa と 78GPa) は加熱処理の有無にかかわらず、従来からの骨折治療に使用されるステンレス鋼に比して、骨形成、骨リモデリングが促進されており、骨折治癒の促進作用を有していることが明らかになった。

## 9 参考文献

1. Einhorn TA (1995) Enhancement of fracture-healing. J Bone Jt Surg Am 77:940–956.
2. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L (2004) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. Osteoporos Int 16:S36–S43. doi:10.1007/s00198-004-1728-9

3. Utvåg SE, Reikerås O Effects of nail rigidity on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 118:7–13. doi: 10.1007/s004020050301
4. Wang GJ, Dunstan JC, Reger SI, et al (1981) Experimental femoral fracture immobilized by rigid and flexible rods (a rabbit model). *Clin Orthop* 286–290.
5. Pankovich AM, Tarabishy IE, Yelda S (1981) Flexible intramedullary nailing of tibial-shaft fractures. *Clin Orthop* 185–195.
6. Aro HT, Wahner HT, Chao EY (1991) Healing patterns of transverse and oblique osteotomies in the canine tibia under external fixation. *J Orthop Trauma* 5:351–364.
7. Augat P, Margevicius K, Simon J, et al (1998) Local tissue properties in bone healing: Influence of size and stability of the osteotomy gap. *J Orthop Res* 16:475–481. doi: 10.1002/jor.1100160413
8. Foux A, Yeadon AJ, Uhthoff HK (1997) Improved fracture healing with less rigid plates. A biomechanical study in dogs. *Clin Orthop* 232–245.
9. Matter P, Burch HB (1990) Clinical experience with titanium implants, especially with the limited contact dynamic compression plate system. *Arch Orthop Trauma Surg* 109:311–313.
10. Tonino AJ, Davidson CL, Klopper PJ, Linclau LA (1976) Protection from stress in bone and its effects. Experiments with stainless steel and plastic plates in dogs. *Bone Jt J* 58–B:107–113.
11. Uhthoff HK, Bardos DI, Liskova-Kiar M (1981) The advantages of titanium alloy over stainless steel plates for the internal fixation of fractures. An experimental study in dogs. *Bone Jt J* 63–B:427–484.
12. Wang GJ, Reger SI, Mabie KN, et al (1985) Semirigid rod fixation for long-bone fracture. *Clin Orthop* 291–298.
13. Lanyon LE, Rubin CT (1984) Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech* 17:897–905. doi: 10.1016/0021-9290(84)90003-4
14. Torrance AG, Mosley JR, Suswillo RFL, Lanyon LE Noninvasive loading of the rat ulna in vivo. *Calcif Tissue Int* 54:241–247. doi: 10.1007/BF00301686

15. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke H-J (1997) Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15:577–584. doi: 10.1002/jor.1100150414
16. Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, et al (1991) Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment. *Bone Jt J* 73-B:654–659.
17. Larsson S, Kim W, Caja VL, et al (2001) Effect of early axial dynamization on tibial bone healing: a study in dogs. *Clin Orthop* 240–251.
18. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, et al (2003) Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 21:1011–1017. doi: 10.1016/S0736-0266(03)00098-6
19. Claes L, Wilke H-J, Augat P, et al (1995) Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation. *Clin Biomech* 10:227–234. doi: 10.1016/0268-0033(95)99799-8
20. Kenwright J (1989) Controlled Mechanical Stimulation in the Treatment of Tibial...: Clinical Orthopaedics and Related Research. In: LWW. [http://journals.lww.com/corr/Fulltext/1989/04000/Controlled\\_Mechanical\\_Stimulation\\_in\\_the\\_Treatment.6.aspx](http://journals.lww.com/corr/Fulltext/1989/04000/Controlled_Mechanical_Stimulation_in_the_Treatment.6.aspx). Accessed 21 Aug 2016
21. Utvåg SE, Korsnes L, Rindal DB, Reikerås O Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: strength and mineralization in rat femora. *J Orthop Sci* 6:576–584. doi: 10.1007/s007760100015
22. Gerich T, Blauth M, Witte F, Krettek C (2001) [Osteosynthesis of fractures of the head of the tibia in advanced age. A matched-pair analysis]. *Unfallchirurg* 104:50–56.
23. Long PH (2008) Medical Devices in Orthopedic Applications. *Toxicol Pathol* 36:85–91. doi: 10.1177/0192623307310951
24. Husby OS, Gjerdet NR, Melster AO (1989) Strain shielding 12 weeks after femoral reaming and nailing in rats. *Acta Orthop Scand* 60:349–352. doi: 10.3109/17453678909149292
25. Miura K, Yamada N, Hanada S, et al (2011) The bone tissue compatibility of a new

- Ti–Nb–Sn alloy with a low Young's modulus. *Acta Biomater* 7:2320–2326. doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.008
26. Head WC, Bauk DJ, Emerson RH (1995) Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 85–90.
  27. Long M, Rack HJ (1998) Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials* 19:1621–1639. doi: 10.1016/S0142-9612(97)00146-4
  28. Husby OS, Gjerdet NR, Melster AO (1989) Strain shielding 12 weeks after femoral reaming and nailing in rats. *Acta Orthop Scand* 60:349–352. doi: 10.3109/17453678909149292
  29. Nourbash PS, Paprosky WG (1998) Cementless femoral design concerns. Rationale for extensive porous coating. *Clin Orthop* 189–199.
  30. Ashman RB, Cowin SC, Van Buskirk WC, Rice JC (1984) A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomech* 17:349–361.
  31. Katsamanis F, Raftopoulos DD (1990) Determination of mechanical properties of human femoral cortical bone by the Hopkinson bar stress technique. *J Biomech* 23:1173–1184.
  32. Cuppone M, Seedhom BB, Berry E, Ostell AE (2004) The longitudinal Young's modulus of cortical bone in the midshaft of human femur and its correlation with CT scanning data. *Calcif Tissue Int* 74:302–309. doi: 10.1007/s00223-002-2123-1
  33. Niinomi M, Hattori T, Morikawa K, et al (2002) Development of Low Rigidity  $\beta$ -type Titanium Alloy for Biomedical Applications. *Mater Trans* 43:2970–2977. doi: 10.2320/matertrans.43.2970
  34. Niinomi M (2008) Metallic biomaterials. *J Artif Organs Off J Jpn Soc Artif Organs* 11:105–110. doi: 10.1007/s10047-008-0422-7
  35. Takahashi E, Sakurai T, Watanabe S, et al (2002) Effect of Heat Treatment and Sn Content on Superelasticity in Biocompatible TiNbSn Alloys. *Mater Trans* 43:2978–2983. doi: 10.2320/matertrans.43.2978

36. Ozaki T, Matsumoto H, Watanabe S, Hanada S (2004) Beta Ti Alloys with Low Young's Modulus. *Mater Trans* 45:2776–2779. doi: 10.2320/matertrans.45.2776
37. Matsumoto H, Watanabe S, Hanada S (2005) Beta TiNbSn Alloys with Low Young's Modulus and High Strength. *Mater Trans* 46:1070–1078. doi: 10.2320/matertrans.46.1070
38. Matsumoto H, Watanabe S, Hanada S (2007) Microstructures and mechanical properties of metastable  $\beta$  TiNbSn alloys cold rolled and heat treated. *J Alloys Compd* 439:146–155. doi: 10.1016/j.jallcom.2006.08.267
39. Nozoe F, Matsumoto H, Jung TK, et al (2007) Effect of Low Temperature Aging on Superelastic Behavior in Biocompatible  $\beta$  TiNbSn Alloy. *Mater Trans* 48:3007–3013. doi: 10.2320/matertrans.MER2007182
40. Tanaka H, Mori Y, Noro A, et al (2016) Apatite Formation and Biocompatibility of a Low Young's Modulus Ti-Nb-Sn Alloy Treated with Anodic Oxidation and Hot Water. *PLOS ONE* 11:e0150081. doi: 10.1371/journal.pone.0150081
41. Hanada S, Masahashi N, Jung T-K, et al (2014) Fabrication of a high-performance hip prosthetic stem using  $\beta$  Ti–33.6Nb–4Sn. *J Mech Behav Biomed Mater* 30:140–149. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.11.002
42. Histing T, Garcia P, Holstein JH, et al (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.007
43. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101. doi: 10.1002/jor.1100020115
44. Mori Y, Adams D, Hagiwara Y, et al (2015) Identification of a progenitor cell population destined to form fracture fibrocartilage callus in Dickkopf-related protein 3–green fluorescent protein reporter mice. *J Bone Miner Metab* 1–9. doi: 10.1007/s00774-015-0711-1
45. Kamimura M, Mori Y, Sugahara-Tobinai A, et al (2015) Impaired Fracture Healing Caused by Deficiency of the Immunoreceptor Adaptor Protein DAP12. *PLOS ONE* 10:e0128210. doi: 10.1371/journal.pone.0128210
46. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al (2003) Fracture healing as a post-



- natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873–884. doi: 10.1002/jcb.10435
47. Sha M, Guo Z, Fu J, et al (2009) The effects of nail rigidity on fracture healing in rats with osteoporosis. *Acta Orthop* 80:135–138. doi: 10.1080/17453670902807490
  48. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031
  49. Svindland AD, Nordsletten L, Reikeras O, Skjeldal S (1995) Periosteal response to transient ischemia: Histological studies on the rat tibia. *Acta Orthop Scand* 66:468–472. doi: 10.3109/17453679508995589
  50. Mølster AO, Gjerdet NR, Langeland N, et al (1987) Controlled bending instability in the healing of diaphyseal osteotomies in the rat femur. *J Orthop Res* 5:29–35. doi: 10.1002/jor.1100050106
  51. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, et al (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop* S132-147.
  52. Kim J-B, Leucht P, Lam K, et al (2007) Bone Regeneration Is Regulated by Wnt Signaling. *J Bone Miner Res* 22:1913–1923. doi: 10.1359/jbmr.070802
  53. Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ (2009) Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep* 7:64. doi: 10.1007/s11914-009-0012-5
  54. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* S7-21.
  55. Histing T, Heerschof K, Klein M, et al (2016) Characterization of the healing process in non-stabilized and stabilized femur fractures in mice. *Arch Orthop Trauma Surg* 136:203–211. doi: 10.1007/s00402-015-2367-7

## 10.謝辞

本研究を行なうにあたり、研究のテーマを与えてくださり研究のご指導とご協力を賜りました東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座整形外科分野 井樋栄二教授、東北大学病院整形外科 森優助教、 上村雅之助教、東北大学金属材料研究所 花田修治名誉教授、正橋直哉教授に厚く御礼申し上げます。

## 11 図

図 1 . . . 加熱による Ti-Nb-Sn 合金のヤング率の変化

図 2 . . . 各温度における Ti-Nb-Sn の応力-歪曲線

図 3A . . . 骨折モデルの作成

図 3B . . . 斜骨折と横骨折

図 4 . . . 組織標本の定量評価

図 5A . . . 単純レントゲン写真

図 5B . . . 単純レントゲン写真（拡大）

図 6A . . . マイクロ CT 画像

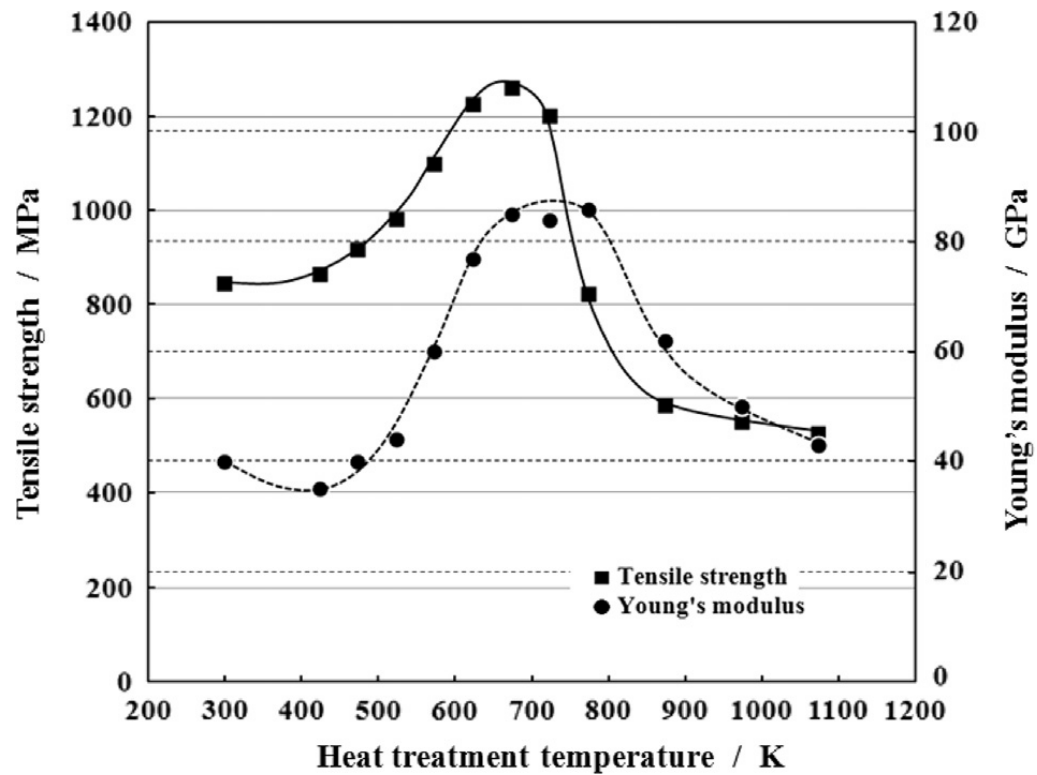
図 6B . . . マイクロ CT 構造解析結果

図 7A . . . 組織所見（アルシアンブルー染色標本）

図 7B . . . 組織標本定量評価結果

図 8 . . . Rt-PCR 解析結果

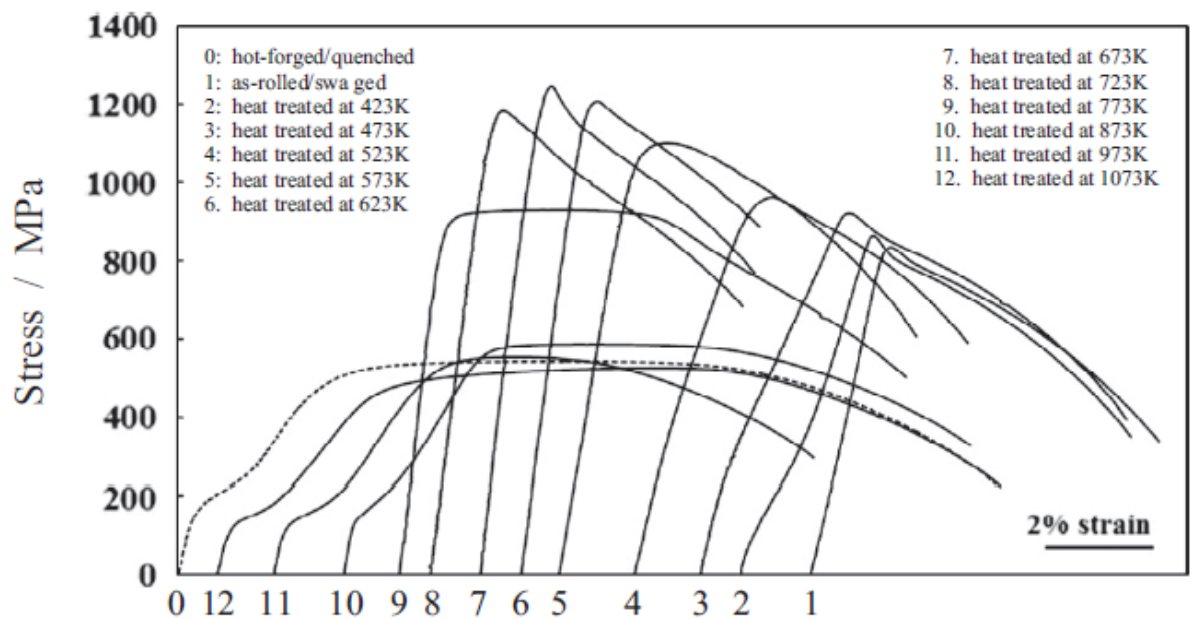
図 1 加熱による Ti-Nb-Sn 合金のヤング率の変化



423K 以上の加熱処理によって Ti-Nb-Sn 合金の弾性率は上昇を始める。また約 700K の加熱処理でヤング率はピークを向かえ、その後は徐々にヤング率は低下する。

参考文献 34 より引用

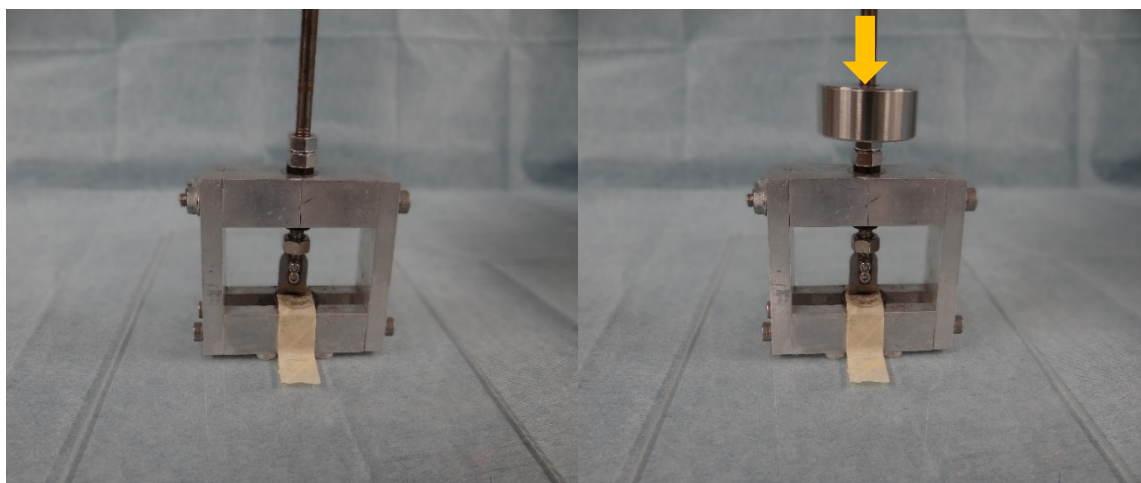
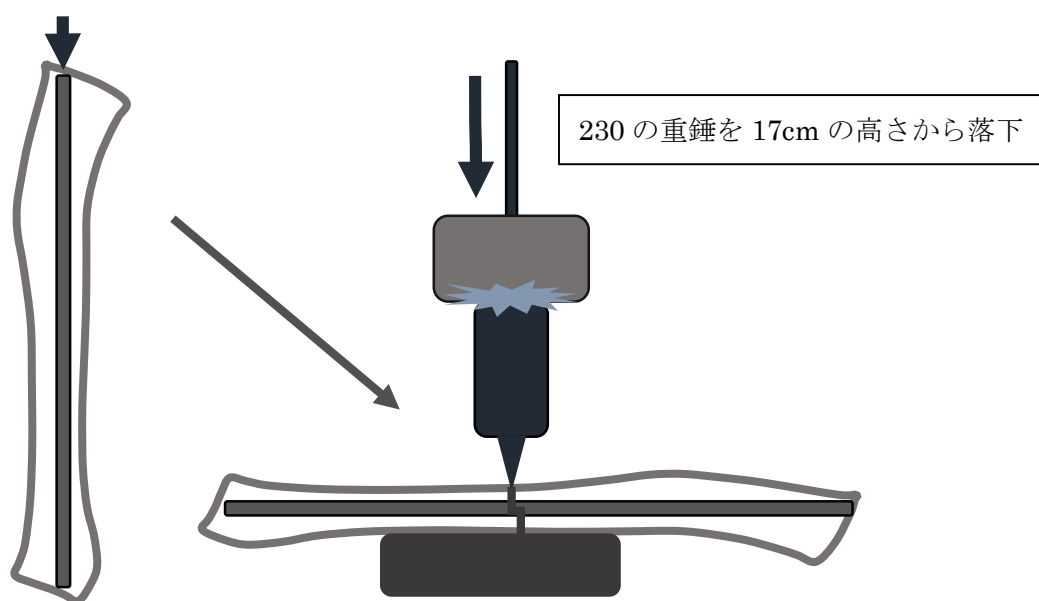
図 2 各温度における Ti-Nb-Sn の応力-歪曲線



各曲線の左の直線部分は弾性範囲であり、この直線部分の傾きがヤング率を表している。  
 傾き大きいほどヤング率は大きくなり同じ応力でも Ti-Nb-Sn は曲がり難い性質がある。

参考文献 34 より引用

図 3-A 骨折モデルの作成



麻酔下にマウスの脛骨近位部に小石灰を置き、脛骨近位端部を露出後、18G 針を使用し  
け髄内釘挿入部に骨孔を作成し、髄内釘を脛骨髄腔内に挿入した。その後、過去の報告に従  
い作成した骨折器械にマウス脛骨を固定し 230g の重錘を 17cm の高さから落下させ再現性  
の高い閉鎖性骨折を作成した。

図 3-B 斜骨折と横骨折

A 斜骨折

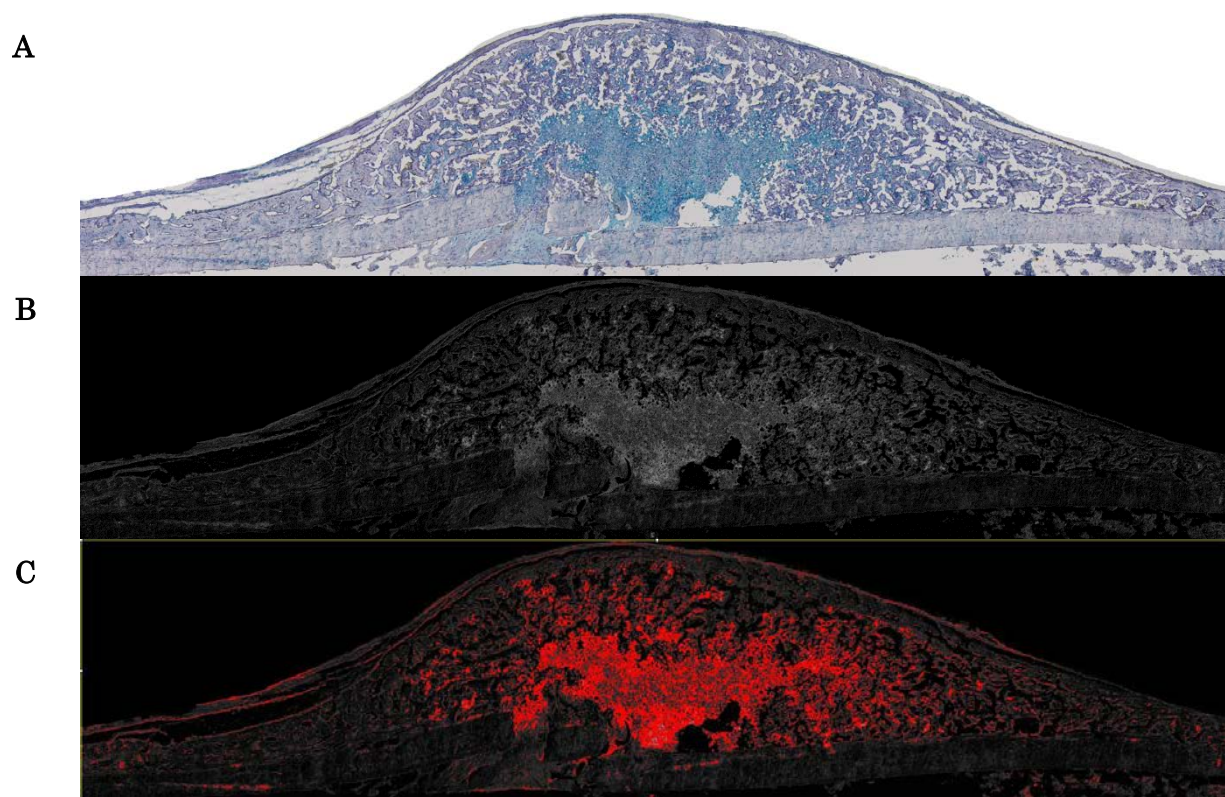


B 横骨折



実験を始めた当初は、骨折作成手技が未熟であったため、斜骨折例が頻発したがb、実験手技を習熟するにつれ、Bのような再現性の高い横骨折を作成することができた。写真は骨折後7日目。矢印は骨折部を指す。

図 4 組織標本の定量評価方法



アルシアンブルー染色標本 A を Image J version1.47t(<http://imagej.nih.gov/ij/>)に取り込み、Split channels を使用して 3 原色（赤、青、緑）に分割しその中の赤、青を選択しその後 difference というコマンドを使用して上記 B のような画像を作成した。さらに A の画像を参照しながら閾値を設定し、C のように軟骨基質領域を抽出した。また、間質部分の閾値も設定して仮骨の総面積から軟骨基質領域、間質を除いて新生骨領域を算出した。



図 5-A X線写真

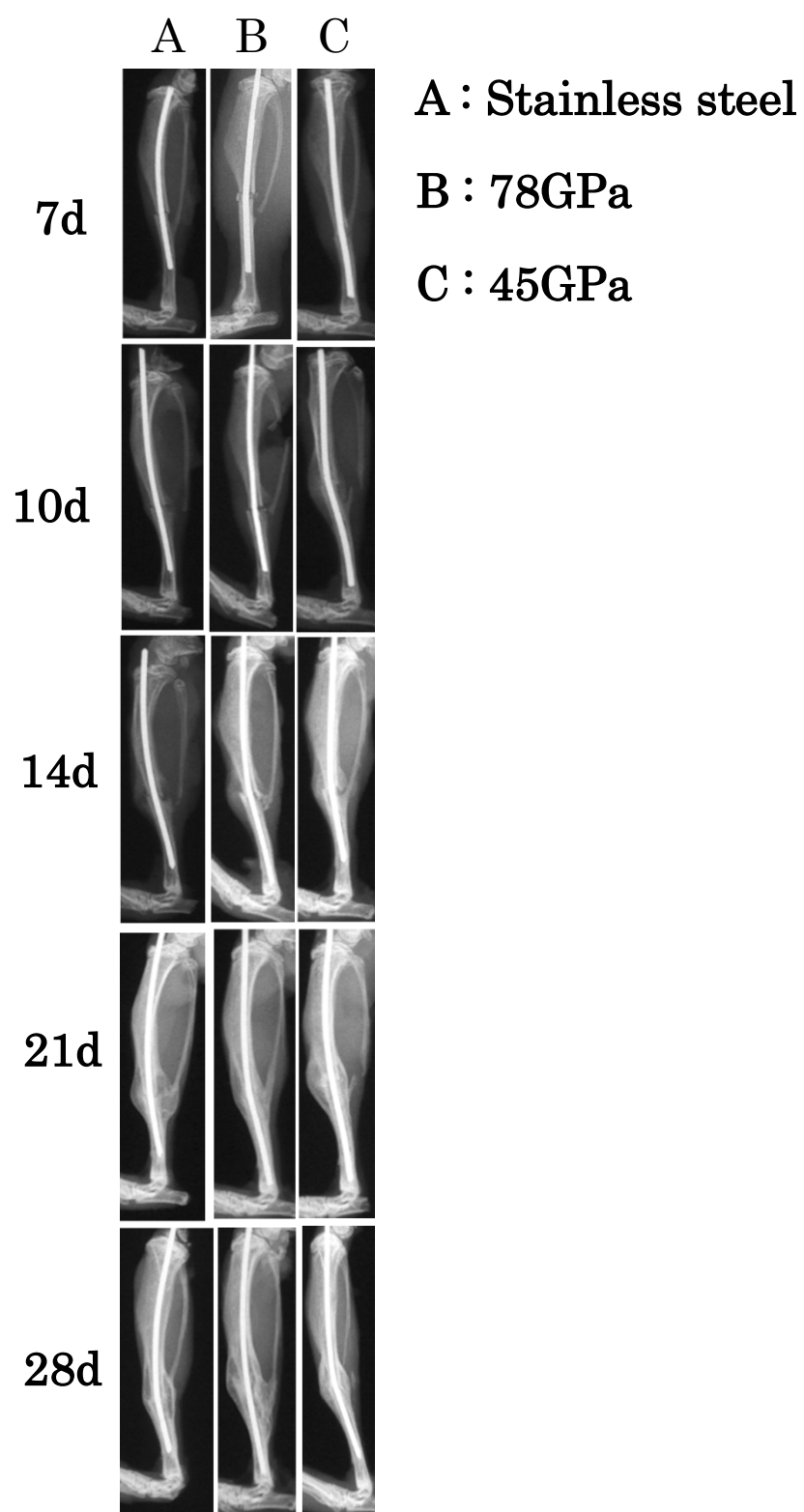
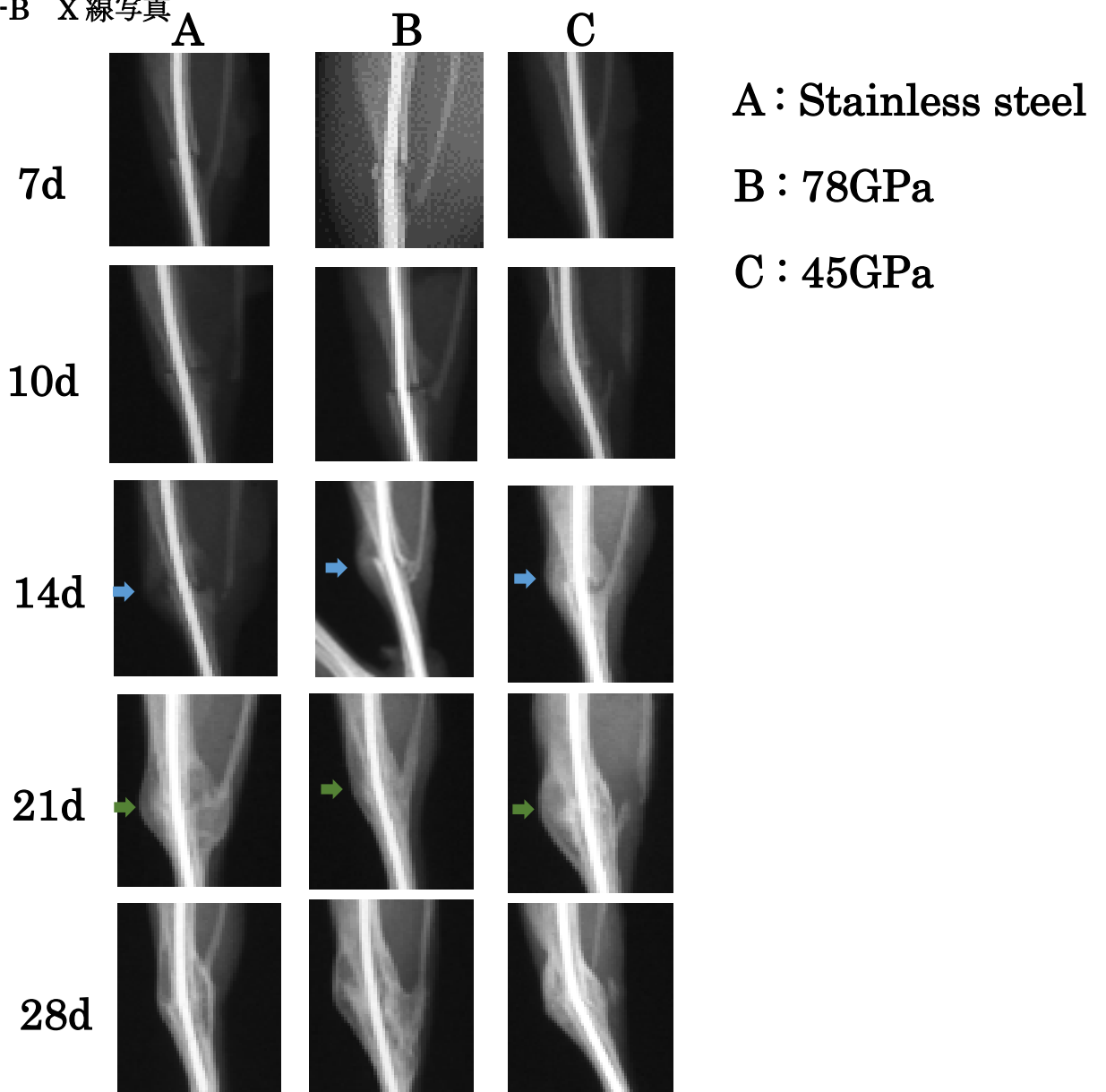
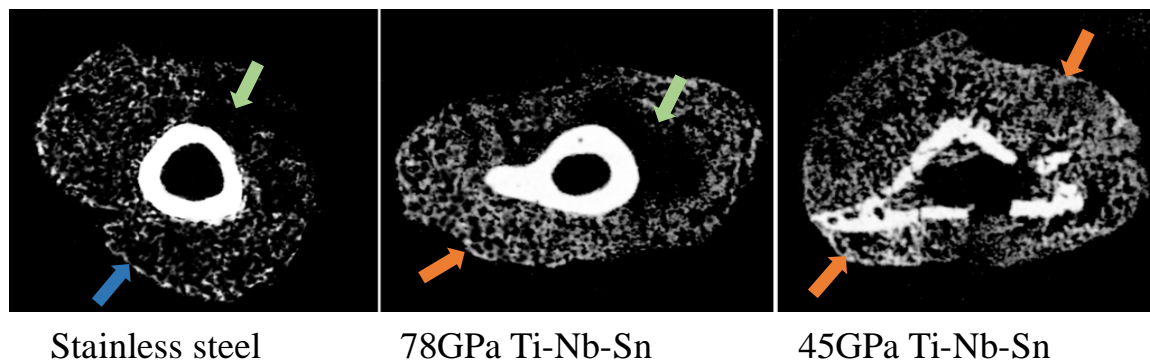


図 5-B X線写真



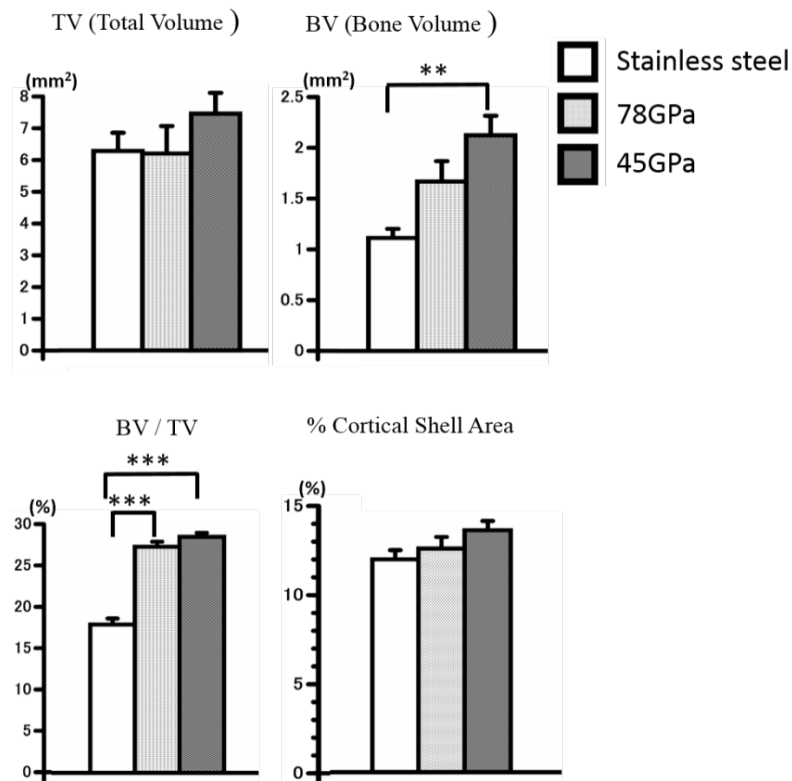
骨折後 14 日で仮骨内の骨性仮骨(➡)がみられるようになり、21 日目では全例骨癒合(➡)が得られた。28 日目では外殻形成が明確になり、皮質骨の骨吸収も見られ骨リモデリングが進行している。

図 6-A マイクロ CT 画像（骨折後 14 日目）



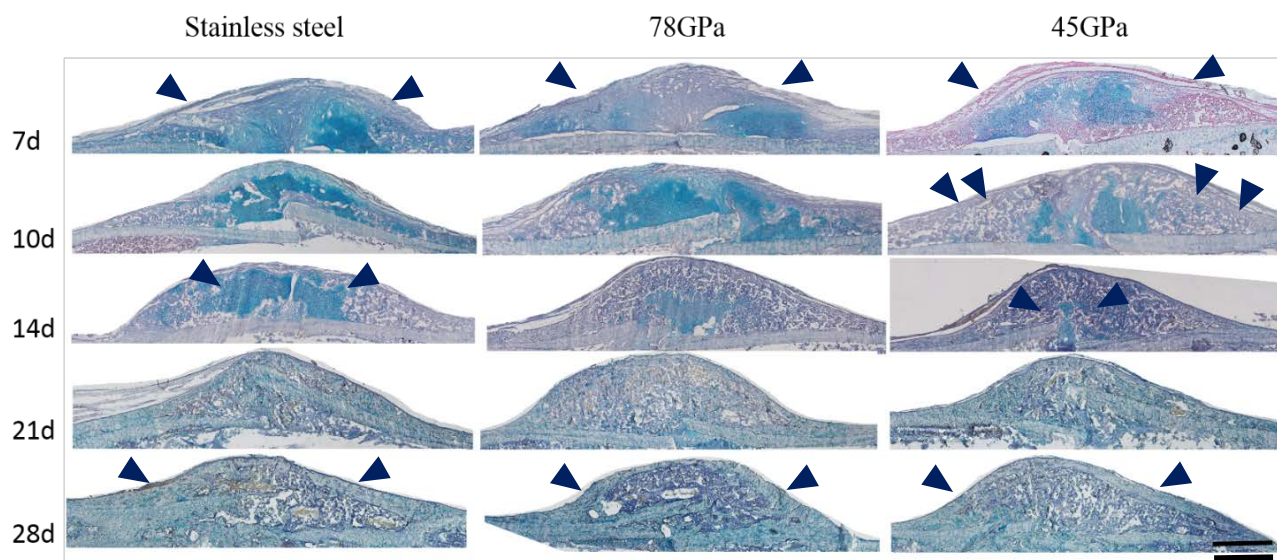
Ti-Nb-Sn 合金群ではステンレス鋼群に比べて、仮骨内の新生骨形成は進行していた。Ti-Nb-Sn 合金群では密度の高い骨形成がみられた（➡）。対照的に Stainless steel 群では骨構造は疎であった（➡）。また、Stainless steel 群と 78GPa Ti-Nb-Sn 群では仮骨内に骨構造のみられない領域がみられ残存している軟骨領域と考えられた（➡）。

図 6-B 構造解析結果（骨折後 14 日目）



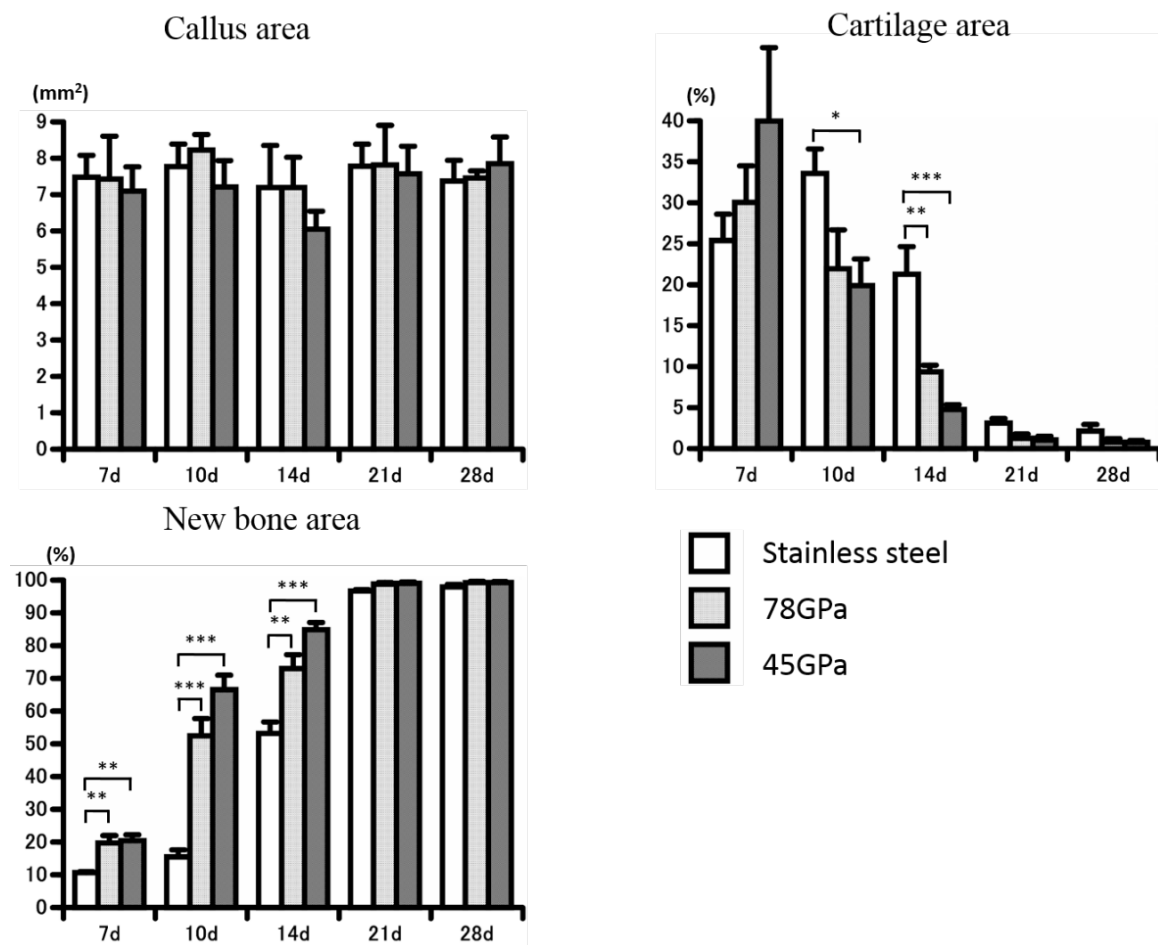
骨折後 14 日目では仮骨総量 (TV) は各群間に差が無かった。骨量 (BV) は 45GPa Ti-Nb-Sn 合金で大きく、BV / TV は Ti-Nb-Sn 合金群で有意に大きかった。 \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

図 7-A 組織所見



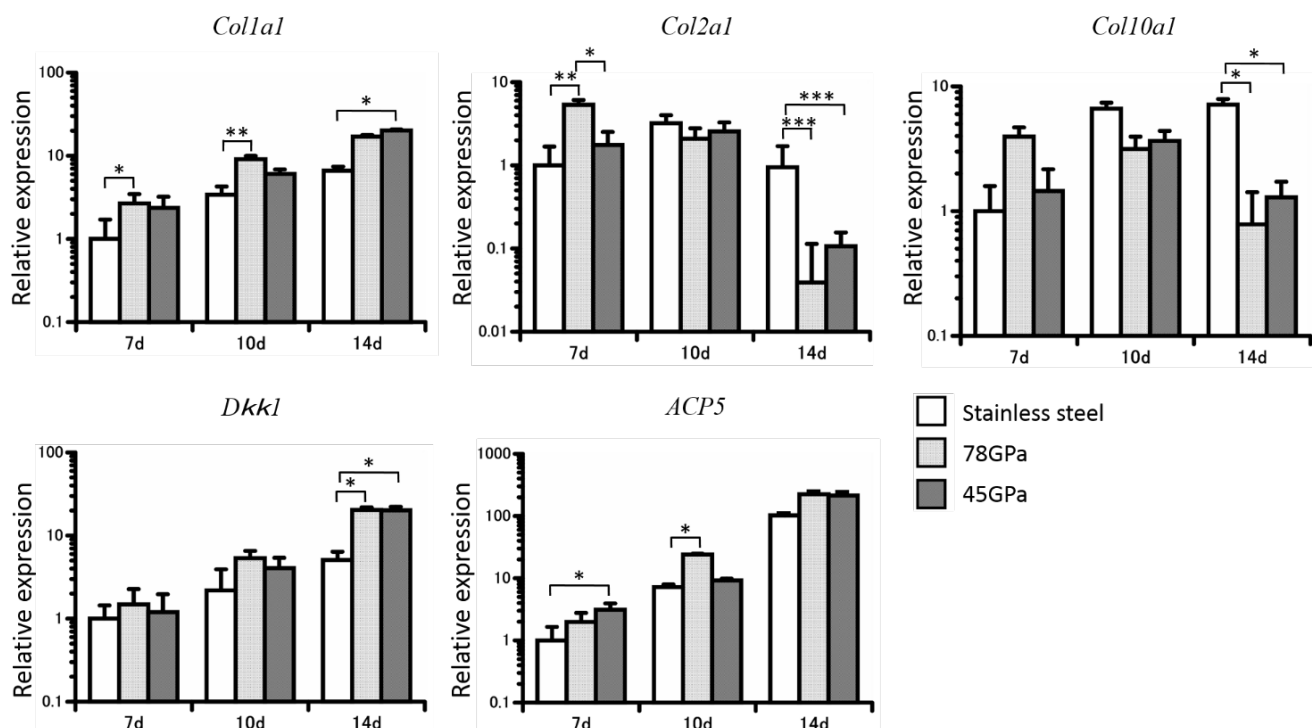
骨折後 7 日目は仮骨内の領域の多くは軟骨組織が占めていた。骨折後 10 日目では 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群では辺縁からの骨化が進行し、仮骨内の軟骨組織の吸収も進んでいた。骨折後 14 日目では Ti-Nb-Sn 合金群では仮骨内のほとんどの領域は辺縁からの軟骨内骨化、仮骨内の新生骨形成が進み、軟骨領域は減少したが、ステンレス鋼群では遺残軟骨領域を認めた。21 日目以降は全群骨癒合が得られ、リモデリングも完了した。 **Scale bar = 500μm**

図 7-B 組織解析結果



骨折後 7 日目から 28 日目まで仮骨量に各群間に有意差はみられなかった。骨折後 7 日目から 14 日目までは Ti-Nb-Sn 合金群で新生骨領域は大きく、また 10 日目から 14 日目までは軟骨領域は減少した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$

図 8 Rt-PCR 解析結果



*Col1a1* 発現量は骨折後 7 日目、10 日目で 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群でステンレス鋼群に比べ有意に多く 14 日目では 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群でステンレス鋼群に比べ有意に多かった。*Col2a1*、*Col10a1* の発現量は骨折後 14 日目で Ti-Nb-Sn 合金群ではステンレス鋼群に比べ有意に少なかった。*Dkk1* の発現量は骨折後 14 日目で Ti-Nb-Sn 合金群ではステンレス鋼群に比べ有意に多かった。*Acp5* の発現量は骨折後 7 日目では 45GPa Ti-Nb-Sn 合金群ではステンレス鋼群に比べ有意に多く、10 日目では 78GPa Ti-Nb-Sn 合金群ではステンレス鋼群に比べ有意に多かった。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$